

PCT/DE 99/03940  
#3

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

FIU



09/857960

## Bescheinigung

DE 99/3346

REC'D 03 FEB 2000	
WIPO	PCT

Die Leica Microsystems Heidelberg GmbH in Heidelberg, Neckar/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten"

am 22. Oktober 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht und erklärt, dass sie dafür die Innere Priorität der Anmeldung in der Bundesrepublik Deutschland vom 17. Dezember 1998, Aktenzeichen 198 58 431.8, in Anspruch nimmt.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol G 01 N 15/10 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 24. Januar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 50 909.3

Weilmayr

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

4211/P/028

Heidelberg, 21. Oktober 1999/ph

## **P a t e n t a n m e l d u n g**

der Firma

Leica Microsystems Heidelberg GmbH  
Im Neuenheimer Feld 518

69120 Heidelberg

betreffend ein

**„Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher  
Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten“**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten, insbesondere mittels konfokaler Laserscanmikroskopie.

Grundsätzlich handelt es sich hierbei um ein Nachweis- bzw. Markierungsverfahren, insbesondere um ein Verfahren, wie es im Rahmen der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie im biomedizinischen Bereich Anwendung findet. Die bislang angewandte Fluoreszenzmikroskopie ist jedoch in der Praxis äußerst problematisch, zumal die dort verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit der Zeit ausbleichen, nämlich eine die Reproduktion von Untersuchungen ausschließende Ausbleichcharakteristik aufweisen. Aufgrund dieser Ausbleichcharakteristik verändern sich bereits im Verlauf des Mikroskopierens die Fluoreszenzintensitäten, und zwar insbesondere bei anhaltender Bestrahlung des Fluoreszenzfarbstoffs mit Anregungslicht. Dies macht nicht nur eine Reproduktion der Untersuchung unmöglich, erschwert vielmehr auch jede Untersuchung nach bereits erfolgter Bestrahlung des biologisch/medizinischen Präparats oder macht eine solche Untersuchung – im Hinblick auf eine zuverlässige Auswertung – nahezu unmöglich.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein gattungsgemäßes Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten, insbesondere mittels konfokaler Laserscanmikroskopie, derart auszugestalten, daß die Reproduktion der Markierung bzw. des Untersuchungsergebnisses auch nach längerer Bestrahlung gewährleistet ist. Die bei der Fluoreszenzmikroskopie bzw. in Verbindung mit Fluoreszenzfarbstoffanbindung auftretenden Probleme sollen vermieden werden.

Voranstehende Aufgabe wird durch die Merkmale des Patentanspruches 1 gelöst. Danach ist das gattungsbildende Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten dadurch gekennzeichnet, daß den Strukturen Teilchen mit spezifischem Durchmesser und spezifischen Eigenschaften zugeordnet werden und daß der Nachweis der Strukturen durch Nachweis der in bzw. an den Präparaten spezifisch gebundenen Teilchen erfolgt.

In vorteilhafter Weise erfolgt der Nachweis der Teilchen dadurch, daß die Wellenlänge geeigneten Lichts in Abhängigkeit des Durchmessers und der spezifischen Eigenschaften der Teilchen derart gewählt wird, daß sich die Teilchen aufgrund der an den Teilchen auftretenden Mie-Streuung bzw. Mie-Reflexe nachweisen lassen.

Alternativ kann der Nachweis der Teilchen auch durch Detektion des Plasmonen-Signals der Teilchen erfolgen.

Erfindungsgemäß ist erkannt worden, daß das im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie auftretende Problem grundsätzlich auf die Ausbleichcharakteristik der verwendbaren Fluoreszenzfarbstoffe zurückzuführen ist. Erfindungsgemäß wird von dem im biomedizinischen Bereich üblicherweise angewandten Markierungsverfahren abgegangen, werden nämlich die im Präparat interessierenden Strukturen nicht mit irgendwelchen Farbstoffen markiert, sondern mit Teilchen mit spezifischem Durchmesser und spezifischen Materialeigenschaften. Während es bei der Fluoreszenzfarbstoffanbindung auf das Fluoreszenzverhalten der den Strukturen zugeordneten Fluoreszenzfarbstoffe ankommt, spielen die optischen Eigenschaften der Teilchen zunächst keine Rolle. Vielmehr kommt es hierbei auf den Durchmesser und auf die Materialeigenschaften der Teilchen an.

Die Teilchen werden also - sofern erforderlich - mittels geeigneter Bindemittel den jeweiligen Strukturen bzw. Bereichen der Präparate zugeordnet, wobei die Teilchen mit Bindemitteln versehen sein können, die mit bestimmten Strukturen eine chemische Bindung oder eine Bindung aufgrund von Adhäsion eingehen können. Eine rein mechanische Bindung ist ebenfalls denkbar. Nachdem die Teilchen der interessierenden Struktur oder den interessierenden Strukturen zugeordnet sind, erfolgt der Nachweis der Struktur bzw. der Strukturen durch Nachweis der in bzw. an den Präparaten und somit an den jeweiligen Strukturen gebundenen Teilchen. Im Konkreten lassen sich die Strukturen bzw. unterschiedlichen Bereiche in den Präparaten dadurch differenzieren, daß die Wellenlänge geeigneten Lichts in Abhängigkeit des Durchmessers und der spezifischen Eigenschaften der Teilchen derart gewählt wird, daß sich die Teilchen aufgrund der an den Teilchen auftretenden Mie-Streuung nachweisen lassen.

In erfindungsgemäßer Weise wird demnach ein physikalisches Phänomen genutzt, welches in der Fachliteratur als „Mie-Streuung“ bezeichnet wird. Hierzu wird lediglich beispielhaft auf G. Mie, Ann. Physik 3, 377 (1908) verwiesen. Hinsichtlich theoretischer Grundlagen betreffend die Mie-Streuung wird des weiteren verwiesen auf P. Török et al. „Polarised Light Microscopy“ SPIE Vol. 3261, 22 ff. (1998). Unter der nach dem Physiker G. Mie bezeichneten Erscheinung – Mie-Streuung oder Mie-Reflex – versteht man eine Streuung von Licht an Teilchen, wobei mit wachsendem Durchmesser der Teilchen die Streuintensität in Vorwärtsrichtung stärker zunimmt als in Rückwärtsrichtung. Im Gegensatz zur Rayleigh-Streuung hängt die Mie-Streuung sowohl von den Materialeigenschaften (Elektrizitätskonstante, elektrische Leitfähigkeit) als auch von dem Durchmesser der streuenden Teilchen ab.

An dieser Stelle sei noch einmal ganz besonders hervorgehoben, daß in erfindungsgemäßer Weise die Markierung von Bereichen oder Strukturen zu deren differenzierter Untersuchung durch Zuordnung von Teilchen zu diesen Strukturen und durch anschließende Detektion der Teilchen erfolgt, wobei die Detektion der Teilchen durch Ausnutzung der an den Teilchen auftretenden Mie-Streuung erfolgt. Das Phänomen der Mie-Streuung wird somit in erfindungsgemäßer Weise zum Nachweis der den Strukturen zugeordneten Teilchen und somit zum Nachweis der Strukturen selbst genutzt.

Statt des Nachweises über die an den Teilchen auftretende Mie-Streuung kann der Nachweis der Teilchen auch durch Detektion des Plasmonen-Signals erfolgen. Plasmonen sind aus der Literatur schon seit geraumer Zeit bekannt. Es handelt sich hierbei um ein Phänomen aus dem Bereich der Festkörperphysik, bei dem die Elektronen im Leitungsband eines Festkörpers Schwingungen ausführen, die beispielsweise durch Licht geeigneter Wellenlänge induzierbar sind. Dies wird bislang vor allem im Zusammenhang mit Meßgeräten genutzt, deren Funktion auf dem Oberflächen-Plasmonen-Resonanzeffekt beruhen. Lediglich beispielhaft wird dazu auf die US-PS 5,351,127 verwiesen, in der eine entsprechende Anordnung beschrieben ist. Für die Lichtmikroskopie im klassischen Sinne ist jedoch die Erzeugung und der Nachweis von Oberflächen-Plasmonen gemäß der zuvor vorgenannten Druckschrift nicht brauchbar.

Im Rahmen des zuvor genannten alternativen Nachweises der Teilchen durch Detektion des Plasmonen-Signals werden mit geeignetem Licht im konventionellen oder konfokalen Laserscanmikroskop Oberflächen- oder Volumen-Plasmonen-Resonanzen der Teilchen angeregt, die an der nachzuweisenden Struktur spezifisch angebunden sind. Die so angeregten Oberflächen- oder Volumen-Plasmonen-Resonanzen werden dann mit geeigneten Mitteln nachgewiesen. In Abhängigkeit von der Eigenschaft des verwendeten Lichts und der Eigenschaft der verwendeten Teilchen ist ein spezifischer Nachweis unterschiedlicher Teilchen möglich. Beispielsweise ist in sphärischen Teilchen nur eine begrenzte Anzahl von Oberflächen-Plasmonen verfügbar, die vom Durchmesser, der Elektronendichte und der Dielektrizitätseigenschaft der Teilchen abhängen.

In vorteilhafter Weise wird zur Beleuchtung der Teilchen linear polarisiertes Licht vorgegebener Wellenlänge verwendet, um nämlich den Mie-Effekt bzw. die an den Teilchen auftretende Mie-Streuung besonders gut nutzen bzw. detektieren zu können. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Wellenlänge des Lichts größer oder in etwa gleich dem Durchmesser der Teilchen ist.

In besonderes vorteilhafter Weise könnte die Wellenlänge des Lichts im Bereich zwischen 300 nm und 1500 nm liegen. Die Größe der Teilchen könnte unterhalb des optischen Auflösungsvermögens liegen. Im Konkreten kommt hier ein Teilchendurchmesser im Bereich zwischen 10 nm und 1000 nm in Frage, um nämlich die Mie-Streuung zur Detektion der Teilchen optimal nutzen zu können.

In weiter vorteilhafter Weise wird die Wellenlänge des Lichts – bei gegebener Teilchengröße und gegebenen spezifischen Eigenschaften der Teilchen – derart gewählt, daß ein maximaler Mie-Reflex nachweisbar ist. Ausgehend von den hier zugrundeliegenden theoretischen Grundlagen gemäß den eingangs zitierten Literaturstellen wird hierzu auf die einzige Figur verwiesen, die für bestimmte Teilchendurchmesser, nämlich in dem dargestellten Fall für Partikel mit größerem und mit kleinerem Durchmesser, die aufgrund der Mie-Streuung detektierbare Reflexe in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Beleuchtungslichts zeigt. Gemäß dieser Darstellung läßt sich bei gegebener Teilchengröße diejenige Wellenlänge des Lichts auswählen, bei der – bei einem bestimmten Teilchen mit vorgegebenem

Durchmesser – ein maximaler Mie-Reflex bzw. eine maximale Mie-Streuung nachweisbar und somit detektierbar ist.

Grundsätzlich ist es möglich, daß nicht nur ein Bereich des Präparats mit einem Typ von Teilchen – gleichen Durchmessers und gleicher Eigenschaften – versehen wird, sondern daß vielmehr voneinander zu differenzierende Bereiche des Präparates mit Teilchen unterschiedlicher Durchmesser versehen werden, so daß mittels geeignetem Licht unterschiedlicher Wellenlängen die Bereiche simultan detektierbar sind. Ebenso ist es möglich, die zu differenzierenden Bereiche des Präparats mit Teilchen unterschiedlicher spezifischer Eigenschaften – bei unterschiedlichen oder gleichen Durchmessern – zu versehen, so daß mittels geeignetem Licht unterschiedlicher oder gleicher Wellenlängen die Bereiche simultan detektierbar sind. Beide Varianten zur Differenzierung zwischen unterschiedlichen Bereichen des Präparats sind realisierbar.

Bei den zur Markierung dienenden Teilchen handelt es sich bevorzugt um Metallteilchen, und zwar aufgrund deren Elektrizitätskonstante und elektrischer Leitfähigkeit. Ebenso kann es sich bei den Teilchen um an der Oberfläche metallisierte Teilchen handeln. Die Teilchen sind weiter vorzugsweise ellipsoid oder als Kugeln ausgeführt, um nämlich eine homogene Mie-Streuung an den Teilchen zu erhalten.

Der Nachweis der Teilchen über die dort auftretende Mie-Streuung bzw. über die dort auftretenden Mie-Reflexe kann über ein Mikroskop erfolgen, und zwar sowohl im Transmissionsmikroskop-Modus als auch im Reflexionsmikroskop-Modus. Erfolgt der Nachweis im Transmissionsmikroskop-Modus, so könnte ein konventionelles Polarisations-Transmissionsmikroskop oder ein konfokales Polarisations-Transmissionsmikroskop verwendet werden. Erfolgt der Nachweis im Reflexionsmikroskop-Modus, könnte ein konventionelles Polarisations-Reflexionsmikroskop oder ein konfokales Polarisations-Reflexionsmikroskop zur Realisierung der Nachweismethode verwendet werden.

Als Lichtquelle kommt beispielsweise eine Hochdruckdampflampe in Frage, wobei diese vorzugsweise wellenlängenselektierende und polarisierende Mittel aufweisen sollte. Diese wellenlängenselektierenden und polarisierenden Mittel können einer herkömmlichen Hochdruckdampflampe auch – separat – nachgeschaltet sein.

In besonders vorteilhafter Weise läßt sich als Lichtquelle ein Laser verwenden, insbesondere dann, wenn die konfokale Laserscanmikroskopie angewandt werden soll. In vorteilhafter Weise handelt es sich hier um einen Laser, der polarisiertes Licht einer Wellenlänge emittiert. Ebenso ist der Einsatz eines Lasers denkbar, der polarisiertes Licht mehrerer unterschiedlicher Wellenlängen emittiert, wobei dem Laser wellenlängenselektierende Mittel – integral oder separat – nachgeordnet sind. Auf konventionelle Laser und konventionelle wellenlängenselektierende Mittel kann hier zurückgegriffen werden.

Zum optimalen Nachweis der Mie-Signale ist es von weiterem Vorteil, wenn man einen dem Laser nachgeordneten optisch-parametrischen Oszillator (OPO) als Lichtquelle verwendet. Dadurch ist es nämlich möglich, die Beleuchtungswellenlänge quasi kontinuierlich einzustellen, wodurch für eine bestimmte Teilchenart maximale Nachweissignale detektierbar sind.

Im Hinblick auf die Analyse des Präparats ist es von Vorteil, wenn zur Auswertung mehrere Bildaufnahmen hinzugezogen werden, um nämlich Fehler bei der Bildaufnahme eliminieren bzw. kompensieren zu können. Insoweit könnte zu einer Bildaufnahme zusätzlich mit dem gleichen Mikroskop ein konventionelles durchlichtmikroskopisches Bild aufgenommen und bei der Bildauswertung berücksichtigt werden. Digitale Bildverarbeitungsmethoden können Anwendung finden. Jedenfalls lassen sich mit dem Vergleich eines konventionellen Durchlichtmikroskopbildes systematische Fehler des jeweiligen Mikroskops eliminieren bzw. kompensieren.

Ebenso ist es denkbar, daß zur Analyse des Präparats zu einer Bildaufnahme zusätzlich mit dem gleichen Mikroskop ein konventionelles reflexionsmikroskopisches Bild aufgenommen und bei der Bildaufnahme berücksichtigt wird. Auch hier lassen sich digitale Bildverarbeitungsmethoden anwenden. Die Verarbeitung eines reflexionsmikroskopischen Bildes mit einem durchlichtmikroskopischen Bild des Präparats ist ebenso denkbar, sofern beide Aufnahmen über das gleiche Mikroskop aufgenommen sind. Diese Aufnahmen werden zur Analyse des Präparats herangezogen und bei der Bildauswertung nach Anwendung digitaler Bildverarbeitungsmethoden berücksichtigt.



Im Hinblick auf die Bildaufnahme und anschließende Bildverarbeitung ist es von weiterem Vorteil, wenn mehrere Bildaufnahmen unter verschiedenen Beleuchtungs-/Detektionswinkeln durchgeführt werden. Auch diese Bildaufnahmen können bei der Bildauswertung berücksichtigt werden, um beispielsweise die Analyse bzw. das Ergebnis verfälschende Schatteneffekte oder dergleichen eliminieren zu können. Auch hier lassen sich digitale Bildverarbeitungsmethoden anwenden.

Das zum Nachweis der Teilchen und somit zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen dienenden Licht kann über eine einzige Lichtquelle bereitgestellt werden, so beispielsweise über eine Laserlichtquelle gemäß der voranstehenden Beschreibung. Ist es jedoch erforderlich, zum Nachweis von Teilchen mit unterschiedlichen Durchmessern und/oder mit unterschiedlichen Eigenschaften Licht mit mehreren Wellenlängen bereitzustellen, so können dazu mehrere Lichtquellen verwendet werden, die Licht mit geeigneten Wellenlängen simultan oder zeitlich versetzt emittieren. Insoweit ist eine simultane oder zeitlich versetzte Detektion der den unterschiedlichen Strukturen zugeordneten Teilchen möglich.

Bereits zuvor ist erwähnt worden, daß es sich bei den Teilchen einerseits um metallische Teilchen und andererseits um Teilchen mit metallischer Oberfläche handeln kann. Zur Bindung der Teilchen an das Präparat bzw. an die jeweiligen Strukturen ist es von ganz besonderem Vorteil, wenn die Teilchen des weiteren oberflächenbeschichtet sind und wenn die Beschichtung eine spezifische Bindung an entsprechend komplementäre Strukturen des Präparats ermöglicht. Die Bindung kann mechanisch, adhäsiv oder gar chemisch erfolgen.

Abschließend sei ganz besonders hervorgehoben, daß das erfindungsgemäße Verfahren gegenüber der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie den enormen Vorteil hat, daß die zur Markierung dienenden Teilchen – im Gegensatz zu den Fluoreszenzfarbstoffen – sich im Zeitverlauf und während der Bestrahlung nicht verändern. Des weiteren müssen die zur Ermittlung der Mie-Streuung bzw. der Mie-Reflexion dienenden Sensoren nicht so sensitiv ausgelegt sein, wie dies bei der Fluoreszenzmikroskopie – zur Detektion der Fluoreszenzerscheinungen – der Fall ist. Sind die Präparate bzw. deren Strukturen einmal mit den hier verwendeten Teilchen präpariert, lassen sich weitere Untersuchungen an den Präparaten auch nach erheblicher Bestrahlung reproduzierbar durchführen. Jedenfalls sind dabei nicht die zur Markie-

rung dienenden Teilchen problematisch, sondern lediglich die Haltbarkeit des Präparats selbst. Auf sich zeitlich verändernde Markierungen ist in erfindungsgemäßer Weise jedenfalls nicht mehr zu achten.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten, insbesondere mittels konfokaler Laserscannmikroskopie,

dadurch gekennzeichnet, daß den Strukturen Teilchen mit spezifischem Durchmesser und spezifischen Eigenschaften zugeordnet werden und daß der Nachweis der Strukturen durch Nachweis der in bzw. an den Präparaten spezifisch gebundenen Teilchen erfolgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Teilchen dadurch erfolgt, daß die Wellenlänge geeigneten Lichts in Abhängigkeit des Durchmessers und der spezifischen Eigenschaften der Teilchen derart gewählt wird, daß sich die Teilchen aufgrund der an den Teilchen auftretenden Mie-Streuung nachweisen lassen.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Teilchen dadurch erfolgt, daß die Wellenlänge geeigneten Lichts in Abhängigkeit des Durchmessers und der spezifischen Eigenschaften der Teilchen derart gewählt wird, daß sich die Teilchen aufgrund des an den Teilchen auftretenden Plasmonen-Signals nachweisen lassen.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß linear polarisiertes Licht vorgegebbarer Wellenlänge verwendet wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Wellenlänge des Lichts größer oder in etwa gleich dem Durchmesser der Teilchen ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Wellenlänge des Lichts in einem Bereich zwischen 300 nm und 1500 nm liegt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Größe der Teilchen unterhalb des optischen Auflösungsvermögens des Mikroskops liegt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchen einen Durchmesser im Bereich zwischen 10 nm und 1500 nm haben.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Wellenlänge des Lichts derart gewählt wird, daß bei gegebener Teilchengröße und spezifischer Eigenschaft der Teilchen ein maximaler Mie-Reflex bzw. Plasmonen-Reflex nachweisbar ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zu differenzierende Bereiche des Präparats mit Teilchen unterschiedlicher Durchmesser versehen werden, so daß mittels geeignetem Licht unterschiedlicher Wellenlängen die Bereiche simultan oder nacheinander detektierbar sind.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß zu differenzierende Bereiche des Präparats mit Teilchen unterschiedlicher spezifischer Eigenschaften versehen werden, so daß mittels geeignetem Licht unterschiedlicher oder gleicher Wellenlängen die Bereiche simultan oder nacheinander detektierbar sind.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Teilchen um Metallteilchen handelt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Teilchen um an der Oberfläche metallisierte Teilchen handelt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchen als Ellipsoide oder Kugeln ausgeführt sind.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Teilchen über die dort auftretenden Mie-Reflexe bzw. Plasmonen-Reflexe im Transmissionsmikroskop-Modus erfolgt.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroskop ein konventionelles Polarisations-Transmissionsmikroskop verwendet wird.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroskop ein konfokales Polarisations-Transmissionsmikroskop verwendet wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der spezifische Nachweis der Teilchen über die dort auftretenden Mie-Reflexe bzw. Plasmonen-Reflexe im Reflexionsmikroskop-Modus erfolgt.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroskop ein konventionelles Polarisations-Reflexionsmikroskop verwendet wird.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroskop ein konfokales Polarisations-Reflexionsmikroskop verwendet wird.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß als Lichtquelle eine Hochdruckdampflampe, vorzugsweise mit wellenlängenselektierenden und polarisierenden Mitteln, verwendet wird.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß als Lichtquelle ein Laser verwendet wird, der polarisiertes Licht einer Wellenlänge emittiert.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß als Lichtquelle ein optisch-parametrischer Oszillator (OPO) verwendet wird, mit dem die Wellenlänge des Beleuchtungslichts variiert werden kann, mit dem Ziel, ein für eine bestimmte Teilchenart maximales Mie-Signal bzw. Plasmonen-Signal messen zu können.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß als Lichtquelle ein Laser verwendet wird, der polarisiertes Licht mehrerer unterschiedlicher Wellenlängen emittiert, wobei dem Laser wellenlängenselektierende Mittel – integral oder separat – nachgeordnet sind.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß zur Analyse des Präparats zu einer Bildaufnahme zusätzlich mit dem gleichen Mikroskop ein konventionelles durchlichtmikroskopisches Bild aufgenommen und bei der Bildauswertung, beispielsweise mit digitalen Bildverarbeitungsmethoden, berücksichtigt wird.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß zur Analyse des Präparats zu einer Bildaufnahme zusätzlich mit dem gleichen Mikroskop ein konventionelles reflexionsmikroskopisches Bild aufgenommen und bei der Bildauswertung, beispielsweise mit digitalen Bildverarbeitungsmethoden, berücksichtigt wird.

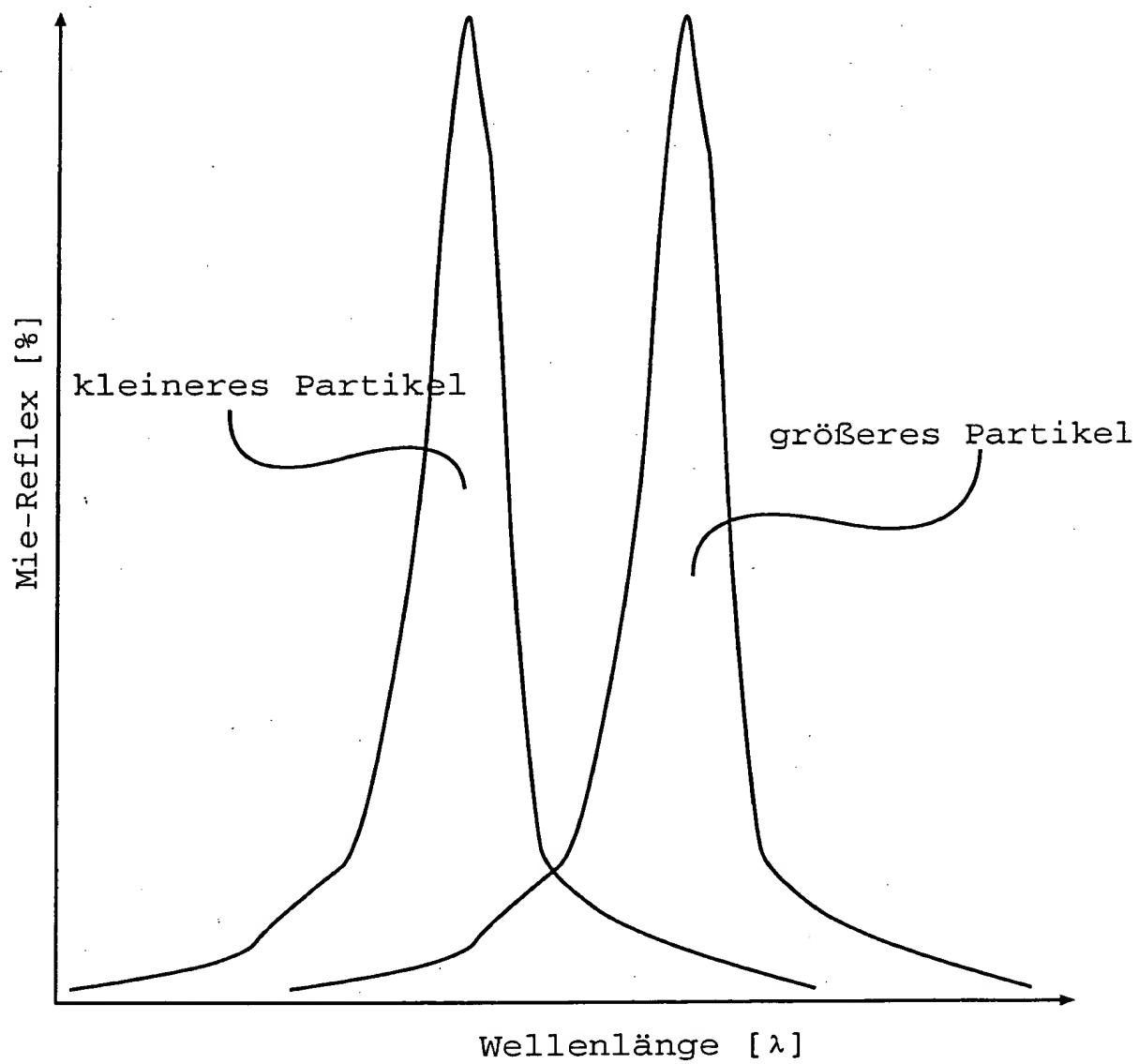
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß sowohl ein reflexionsmikroskopisches Bild als auch ein durchlichtmikroskopisches Bild des Präparats über das gleiche Mikroskop aufgenommen, zur Analyse des Präparats herangezogen und bei der Bildauswertung, beispielsweise mittels digitaler Bildverarbeitungsmethoden, berücksichtigt wird.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß Bildaufnahmen unter verschiedenen Beleuchtungs-/Detektionswinkeln durchgeführt werden und daß diese Bildaufnahmen bei der Bildauswertung, beispielsweise mittels digitaler Bildverarbeitungsmethoden, berücksichtigt werden.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß das zum Nachweis der Teilchen dienende Licht über eine einzige Lichtquelle bereitgestellt wird.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das zum Nachweis der Teilchen mit unterschiedlichen Durchmessern und/oder unterschiedlichen Eigenschaften dienende Licht über mehreren Lichtquellen geeigneter Wellenlänge simultan oder zeitlich versetzt bereitgestellt wird.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchen oberflächenbeschichtet sind und daß die Beschichtung eine spezifische Bindung an entsprechend komplementäre Strukturen des Präparats ermöglicht.



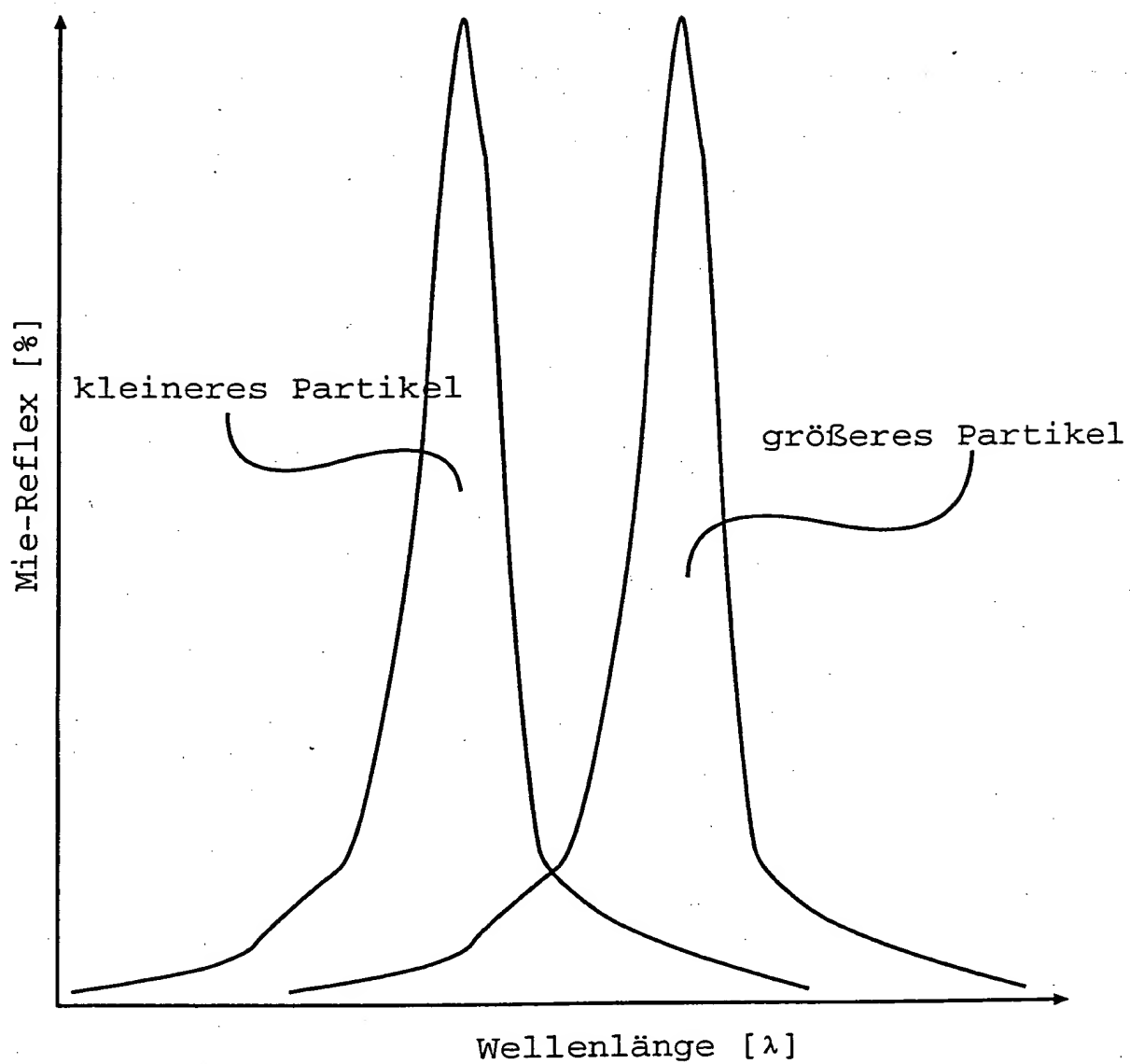
**Fig.**

## **Zusammenfassung**

Ein Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten, insbesondere mittels konfokaler Laserscanmikroskopie, ist dadurch gekennzeichnet, daß den Strukturen Teilchen mit spezifischem Durchmesser und spezifischen Eigenschaften zugeordnet werden und daß der Nachweis der Strukturen durch Nachweis der in bzw. an den Präparaten spezifisch gebundenen Teilchen erfolgt.

(einzige Figur)





**Fig.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**